

Auswahl und Validierung immunologischer Indikatoren für entzündliche Erkrankungen bei Hochleistungsmilchkühen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicinae

(Dr. rer. med.)

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

vorgelegt von:

Diplom-Ingenieurin (FH) Martina Katharina Zoldan

geboren am 25.12.1986 in Berlin-Lichtenberg

angefertigt am:

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. Frank Emmrich, Institut für klinische Immunologie, Medizinische Fakultät der
Universität Leipzig

Dr. Jörg Lehmann

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.03.2016

Meinem Vater

*Eine wirklich gute Idee erkennt man daran,
dass ihre Verwirklichung von vornherein
ausgeschlossen erschien.*

Albert Einstein

Bibliographische Beschreibung

Zoldan, Katharina

Auswahl und Validierung immunologischer Indikatoren für entzündliche Erkrankungen bei Hochleistungsmilchkühen

Universität Leipzig, Dissertation

53 S., 107 Lit., 2 Abb., 3 Anlagen

Referat

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifikation neuer immunologischer Indikatoren (Biomarker) für den allgemeinen Gesundheitszustand von Hochleistungsmilchkühen. Diese Biomarker sollen möglichst einfach und schnell mittels eines Stalltests nachweisbar sein, weshalb die gelösten Proteine in der Milch im Fokus standen. Die neuen Biomarker sollten nicht nur Mastitis, sondern vor allem auch Entzündungen außerhalb des Euters anzeigen können. Zu Beginn sollte das Gesamtspektrum an Immunkomponenten erfasst werden, weshalb zunächst auf Proteinexpressionsebene angesetzt wurde. Das schloss die Analyse von vorhandenen Immunzellpopulationen in Blut- und Milchproben ein, um einen Überblick über potentielle Produzenten der immunologischen Indikatoren zu erhalten. Es konnte erstmals *Cluster of Differentiation* (CD) 25 (α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, IL2R) auf bovinen polymorphnukleären, neutrophilen Granulozyten (PMN) aus peripherem Blut nachgewiesen werden. Die Expression (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) von CD25 stieg dabei mit dem Schweregrad der entzündlichen Erkrankung an. Die Ergebnisse konnten auf Transkript- wie auch auf Proteinexpressionsebene bestätigt werden. Gleiche Tendenzen waren auch für Milchzellen erkennbar. In der statistischen Analyse zeigte CD25 auf PMN im peripheren Blut ein hohes Abgrenzungsvermögen für erkrankte Kühe. Die Messung von CD25 auf PMN könnte somit zur Bestimmung des allgemeinen Gesundheitszustandes von Hochleistungsmilchkühen genutzt werden.

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einführung.....	1
1.1 Milch und Milchproduktion.....	2
1.1.1 Das Grundnahrungsmittel Milch	2
1.1.2 Milchrindzucht und Tierwohlaspekt.....	3
1.1.3 Milchproduktion im Verlauf der Laktation beim Milchrind	4
1.2 Zellen und Mediatoren des Immunsystems	5
1.2.1 Polymorphnukleäre, neutrophile Granulozyten und ihre Rolle beim Milchrind.....	7
1.3 Gesundheitsmanagement im Milchbetrieb	10
1.3.1 Häufige Rindererkrankungen im Verlauf der Laktation.....	10
1.3.2 Betriebliche Gesundheitsüberwachung	11
1.4 Ziel der Arbeit	13
2 Publikation	15
3 Zusammenfassung.....	26
4 Literaturverzeichnis	30
5 Abkürzungsverzeichnis	38
6 Abbildungsverzeichnis	39
7 Anlagen.....	40
7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	40
7.2 Persönlicher und wissenschaftlicher Werdegang	41
7.2.1 Lebenslauf	41
7.2.2 Publikationen	43
7.3 Danksagung.....	47

1 Einführung

Die Kuhmilch ist seit Jahrtausenden ein Grundnahrungsmittel für den Menschen. Inhaltsstoffe von Kolostrum und Milch gelten im Allgemeinen als gesundheitsfördernd für den Konsumenten. Mit der wachsenden Population steigt der Bedarf an Lebensmitteln tierischer Herkunft enorm. Das wirkt sich auch in verstärktem Druck auf die Milchindustrie aus. Bei gleich bleibendem Milchpreis sind die Milchbetriebe gezwungen, Herden zu vergrößern, Personal zu reduzieren und ihren Ertrag zu steigern. In den vergangenen 50 Jahren war die Milchrindzucht daher auf eine möglichst hohe Milchproduktionsrate fokussiert, was zu einer erheblichen Einschränkung der Gesundheitsstabilität und Fruchtbarkeit der Kühe geführt hat (Jones *et al.*, 1994; Lucy, 2001). Der Stoffwechsel der Kühe ist durch die erhöhte Milchleistung vor allem zu Beginn der Milchproduktion nach der Kalbung und in der frühen Laktation starken Belastungen ausgesetzt. Eine negative Energiebilanz und daraus resultierende Stoffwechselstörungen beeinflussen den Hormonhaushalt sowie das Immunsystem der Tiere, was zu verminderter Fruchtbarkeit und erhöhter Krankheitsanfälligkeit führt (Ingvarsen und Moyes, 2013). Zusätzlich sind speziell bei Hochleistungsmilchkühen die Effektorfunktionen bestimmter Immunzellen in der Zeit um die Kalbung stark eingeschränkt (peripartale Immunsuppression) (Paape *et al.*, 2003; Simenew und Wondu, 2013), wodurch deren Gesundheit in dieser kritischen Phase streng überwacht werden muss. Für das Gesundheitsmanagement der Milchbetriebe wird daher nach schnellen, objektiven und automatisierten Lösungsansätzen gesucht, um den aktuellen Entwicklungen gerecht zu werden (Hogeveen und Oueltjes, 2003).

Die Auswirkungen der Hochleistungsproduktion in der Milchrindzucht haben aktuell zu einer Fokussierung auf funktionelle Merkmale wie Nutzungsdauer, Fruchtbarkeit und Gesundheitsstabilität geführt. Auch unter Berücksichtigung der wachsenden Achtsamkeit der Gesellschaft bezüglich des Wohlergehens der Tiere, werden innovative und objektive Methoden zur Überwachung und Verbesserung der Tiergesundheit und des Tierwohls zunehmend gefördert (Egger-Danner *et al.*, 2015). Hierzu wird nach neuen Gesundheitsparametern gesucht, die bestenfalls direkt im Betrieb einfach und schnell erhoben werden können. Verbessertes Gesundheitsmanagement könnte außerdem unnötigen Antibiotikaeinsatz und daraus resultierende Gefahren der Resistenzbildung vermeiden.

1.1 Milch und Milchproduktion

1.1.1 Das Grundnahrungsmittel Milch

Seit Jahrtausenden nutzt der Mensch die Kuhmilch als Grundnahrungsmittel. Sie wird als natürliches und gesundes Lebensmittel angesehen und geschätzt. Sehr viel Wert hat die Milch als Lieferant von Vitaminen und Spurenelementen, wie z.B. Kalzium und Vitamin D (Caroli *et al.*, 2011; Dror und Allen, 2014). Der Milchverbrauch der Deutschen liegt aktuell bei über 60 kg pro Kopf und Jahr (bmelv-statistik.de). Rohmilch besteht aus 87,7 % Wasser, 3,5 % Fett, 3,3 % Protein, 4,8 % Laktose und 0,7 % Mineralstoffen (Fox und McSweeney, 1998). Dem Kalb bieten Kolostrum und Milch zum einen die optimale Zusammenstellung an Nährstoffen, zum anderen passive Immunität durch die hohe Konzentration an Immunglobulinen (Ig). Zudem enthalten Kolostrum und Rohmilch weitere gelöste Immunkomponenten wie antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs), Akute-Phase-Proteine (APPs) und Zytokine. Einen beachtlichen Anteil haben ebenfalls Immunzellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Epithelzellen des Euters (Wheeler *et al.*, 2007; Stelwagen *et al.*, 2009). Die Entwicklung des Immunsystems des neugeborenen Kalbs wird somit unterstützt (Kelleher und Lönnerdal, 2001) und auch das Euter wird vor eindringenden Pathogenen geschützt (Sordillo *et al.*, 1997). Die Modulation von Funktionen verschiedener Immunzellen durch Milch oder einzelne Milchproteine konnte in zahlreichen Studien *in vitro* bei verschiedenen Spezies gezeigt werden (Cross und Gill, 2000). Die antimikrobiellen und immunmodulatorischen Wirkungen von Kolostrum und Milch werden zunehmend auch kommerziell oder zu therapeutischen Zwecken genutzt (Rathe *et al.*, 2014). AMPs wie Laktoferrin (LTF) oder Laktoperoxidase werden in extrahierter Form in Kinderersatznahrung oder als Konservierungsmittel eingesetzt (Horton, 1995). Standardisierte Kolostrumkonzentrate können als biologisches Präparat zur Therapie von Infektionen des gastrointestinalen Systems genutzt werden (Struff und Sprotte, 2007; Struff und Sprotte, 2008). Milch wird außerdem zur Herstellung von *Functional Foods*, wie z.B. Probiotika, eingesetzt. Die Modulation des intestinalen Immunsystems durch Probiotika wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen (Gill und Prasad, 2008).

Die hohe Qualität von Rohmilch und Milcherzeugnissen ist durch die Milchhygiene-Richtlinie der europäischen Wirtschaftsgemeinschaft sichergestellt (Richtlinie 92/46/EWG des Rates vom 16.Juni, 1992). Diese legt Grenzwerte für den Zellgehalt, die Keimbelastung und den Gehalt an Antibiotikarückständen in der Rohmilch sowie

deren Kontrollen fest. Das heutige Lebensmittel Milch hat jedoch nicht mehr viel mit der Rohmilch gemein. Die Milch gehört stattdessen zu den hoch prozessierten Lebensmitteln. Durch Pasteurisierung oder Sterilisation wird die Lebensmittelsicherheit gewährleistet. Zusätzlich wird sie homogenisiert und optional der Fettgehalt reduziert. Durch die Erhitzung der Milch werden vorhandene Krankheitserreger teilweise oder ganz eliminiert, jedoch verlieren dadurch auch immunologische Komponenten ihre Funktion. Obwohl der Rohmilchkonsum Atemwegserkrankungen vorbeugen (Loss *et al.*, 2015) oder Lebensmittelallergien potentiell beeinflussen kann (Hodgkinson *et al.*, 2014), kompensiert der Nutzen nicht das Risiko der Übertragung von infektiösen Erkrankungen (Potter *et al.*, 1984; Oliver *et al.*, 2009; Robinson *et al.*, 2014; Mungai *et al.*, 2015).

Aber auch der Konsum von wärmebehandelter Milch kann gesundheitliche Risiken für den Verbraucher nach sich ziehen, wenn umwelt- oder produktionsbedingte Verunreinigungen wie z.B. Antibiotikarückstände enthalten sind. Antibiotikarückstände, deren Metabolite oder während der Wärmebehandlung entstandene Reaktionsprodukte können zur Generierung von resistenten Bakterienstämmen und zu deren Anreicherung im Kälberdarm (Pereira *et al.*, 2014) und vermutlich auch im Menschen führen (Jakobsson *et al.*, 2010; Bonyadian *et al.*, 2014). Ebenso können allergische Reaktionen in sensibilisierten Personen hervorgerufen werden (Torres *et al.*, 2014; Terico und Gallagher, 2014; Junza *et al.*, 2014). Daher sind auch der Einsatz von Antibiotika zur Wachstumsförderung, prophylaktischen und therapeutischen Behandlung in der Tierproduktion und dessen Überwachung in der Europäischen Union (EU) in zahlreichen Richtlinien reguliert. Der Einsatz zur Wachstumsförderung ist in der EU seit 2006 verboten (Companyó *et al.*, 2009). Durch regelmäßige Kontrollen der Milchgüte kommt der Verbraucher nur noch selten mit belasteter Milch in Kontakt. Hauptursache für Antibiotikarückstände in Milch sind betriebliche Fehler im Management erkrankter und behandelter Kühe (siehe Abschnitt 1.3.2). Um den Antibiotikaeinsatz zu reduzieren, muss somit als erstes bei der Tiergesundheit angesetzt werden. Nur gesunde Kühe können große Mengen qualitativ hochwertiger Milch produzieren.

1.1.2 Milchrindzucht und Tierwohlaspekt

Die Bevölkerung der Erde wächst stetig und mit ihr der Bedarf an Lebensmitteln tierischer Herkunft. Auch die Milchindustrie muss diesen Entwicklungen begegnen können. Das wurde sowohl auf organisatorischer als auch züchterischer Ebene versucht. Neben der Vergrößerung der Herden werden Routineprozesse, wie Fütterung und Melken, zunehmend automatisiert (Hogeveen und Ouweltjes, 2003).

Bei der Züchtung lag der Fokus auf einer erhöhten Milchleistung (der Weltrekord liegt bei 34.000 kg Milch pro Jahr). Das hatte jedoch drastische Einflüsse auf die Krankheitsanfälligkeit der Tiere (Ingvarsen und Moyes, 2013). Mit dem Anstieg der Milchleistung, war auch ein steigender Aufwand im Gesundheitsmanagement zu verzeichnen (Jones *et al.*, 1994). Dabei bedingen Erkrankungen im Bestand sowohl finanzielle Einbußen als auch Beeinträchtigungen des Wohlergehens der Kühe (Husu-Kallio, 2008).

Deshalb geht die Tendenz bei der Merkmalswichtung aktuell hin zu funktionellen Merkmalen wie Nutzungsdauer, Verhaltensmuster, Temperament, Futterumsatz und Stoffwechseleigenschaften, Fruchtbarkeit, Milchzusammensetzung und auch Gesundheitsstabilität. Herdenmanager favorisieren aus ökonomischen Gründen robuste, leistungsfähige Kühe, die einfach im Umgang sind. Diese Eigenschaften korrelieren häufig mit einer stabilen Gesundheit. Somit können Kosten für tierärztliche Behandlungen sowie der Antibiotikaeinsatz reduziert werden. Die Wirtschaftlichkeit soll maximiert werden, ohne das Wohlergehen der Tiere zu beeinträchtigen (Stear *et al.*, 2001; Egger-Danner *et al.*, 2015).

Die Tendenz in der Züchtung geht ebenfalls auf den achtsamen Verbraucher ein, der zunehmend Bedenken zum Tierwohl und Ansprüche auf gesunde und natürliche Lebensmittel äußert (Croney und Anthony, 2011).

Zur objektiven Beobachtung und Aufzeichnung der funktionellen Merkmale im Rahmen des Herdenmanagements und der Zuchtwertschätzung müssen messbare, phänotypische Parameter zur Verfügung stehen, die bestimmte Befindlichkeits- bzw. Gesundheitszustände auf Einzeltierbasis charakterisieren können. Die Erfassungsmethoden müssen einfach und schnell durchführbar sein, damit Vorteile für Milchviehhalter und Tierärzte unmittelbar ersichtlich werden, um den zeitlichen und materiellen Zusatzaufwand zu rechtfertigen. Ein entscheidender Vorteil wäre die Früherkennung von Krankheiten, um rechtzeitig präventive oder therapeutische Maßnahmen ergreifen zu können (Egger-Danner *et al.*, 2015).

1.1.3 Milchproduktion im Verlauf der Laktation beim Milchrind

Beim Milchrind beträgt die Laktationsdauer durchschnittlich 300 Tage. Nach der Kalbung produziert die Kuh zunächst Kolostrum, welches einen erhöhten Zell- und Trockenmassegehalt hat und Ig in hohen Konzentrationen enthält. Im bovinen Kolostrum ist das IgG₁ am höchsten konzentriert mit einem Anteil am Gesamtimmunglobulingehalt von 81 % (Stelwagen *et al.*, 2009). Das Kalb wird vom Muttertier getrennt gehalten. Das Kolostrum geht nach 10 bis 15 Tagen *post partum* in die reife Milch über, welche die oben genannte (siehe 1.1.1) und zum

menschlichen Verzehr nutzbare Zusammensetzung aufweist. Auch in der reifen Milch ist der IgG₁-Anteil am Gesamtimmunglobulingehalt mit 73 % am höchsten (Stelwagen *et al.*, 2009).

In der Frühlaktation (10 bis 100 Tage *post partum*) wird die maximale Milchleistung erreicht. Die Fütterung muss entsprechend angepasst werden, um das dadurch entstehende Energiedefizit zu minimieren. Über die mittlere und späte Laktation fällt die Tagesmilchmenge kontinuierlich ab. Bei zweimaligem Melken pro Tag tritt die erste Brunst der Kühe durchschnittlich ab 33 Tage nach der Kalbung ein. Die Kühe können dann wieder besamt werden. Die tragende Kuh wird am Ende der späten Laktation trocken gestellt. In der Trockenstehzeit ist die Milchproduktion eingestellt. Das Euter kann sich somit bis zur nächsten Kalbung regenerieren.

Beispiele für optimale Laktationskurven (mittlere Tagesmilchmengen über die Zeit) verschiedener Milchrindrassen sind in Abbildung 1 dargestellt. Die höchste Milchleistung erreichen Rinder der Rasse Holstein-Friesian.

Die maximale Milchmenge einer Laktation ist weiterhin abhängig von Faktoren wie Fütterung, Melkhäufigkeit pro Tag, Dauer der Trockenstehzeit, Anzahl der vorangegangenen Laktationen sowie dem Alter des Tieres aber auch von der Umgebungstemperatur und vor allem vom Gesundheitszustand (Winter *et al.*, 2009).

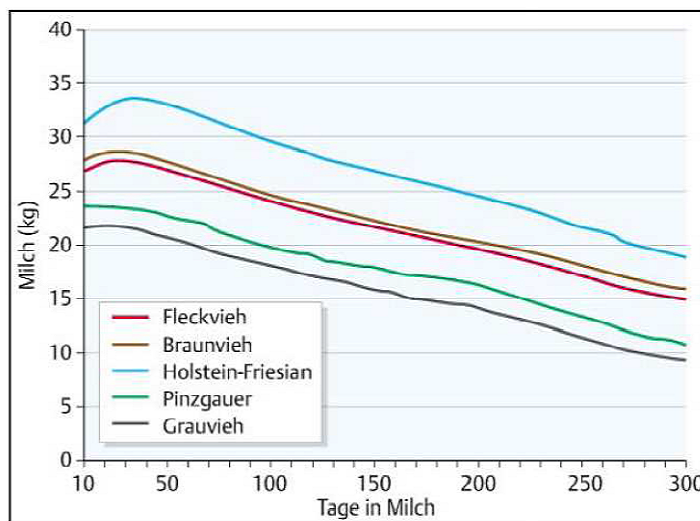


Abbildung 1:
Laktationskurven
verschiedener
Milchrindrassen. Dargestellt ist
die mittlere, tägliche
Milchleistung (kg/d) im Verlauf
der Laktation (Winter *et al.*,
2009).

1.2 Zellen und Mediatoren des Immunsystems

Das Immunsystem schützt bei Infektionen oder Verletzungen den Organismus vor toxischen Substanzen und Pathogenen. Es ist außerdem in der Lage, körpereigene von körperfremden molekularen Strukturen zu unterscheiden.

Immunreaktionen werden hauptsächlich durch verschiedene Typen von Leukozyten und immunologische Mediatoren, wie Zytokine und Chemokine, sowie verschiedene im Serum gelöste Komponenten, wie das Komplementsystem, APP und Antikörper vermittelt.

Die Immunzellen werden aus pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet. Daraus entwickeln sich myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen, aus denen jeweils Zellen der myeloischen und der lymphatischen Reihe heranreifen. Die angeborene Immunantwort wird hauptsächlich durch Zellen der myeloischen Reihe vermittelt, zu welchen periphere Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen zählen. Zu deren Aufgaben gehören die Erkennung pathogener Muster, Phagozytose, Eliminierung von Erregern, Auslösen einer Entzündungsreaktion und Antigenpräsentation.

Die erworbene oder adaptive Immunantwort wird hauptsächlich durch Zellen der lymphatischen Reihe wie B- und T-Lymphozyten vermittelt. Eine Ausnahme sind hier die Natürlichen Killer- (NK-) Zellen, NK-T-Zellen sowie $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die einen Teil der angeborenen Immunität übernehmen. NK-Zellen können virusinfizierte oder Tumorzellen erkennen und eliminieren. NK-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten tragen unter anderem zur Regulation von Immunantworten bei.

Aktiviert B-Zellen differenzieren zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Bei den T-Zellen werden verschiedene Populationen unterschieden. Subpopulationen von T-Helfer-Zellen (T_H) übertragen zusätzliche Signale an Makrophagen oder antigen-stimulierte B-Zellen, um deren Effektorfunktionen zu aktivieren oder zu verstärken. Zytotoxische T-Zellen (T_C) sind in der Lage, infizierte Zellen zu töten. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zeigen antiinflammatorische, immunregulierende Eigenschaften. Nach einer überstandenen Infektion oder nach einer erfolgreich durchgeführten Impfung bleiben langlebige T- und B-Gedächtniszellen zurück, die auch nach Jahren bei einer Reinfektion sehr schnell wieder aktiviert werden können. Die Immunzellen interagieren über Botenstoffe (Zytokine, Chemokine) und Zell-Zell-Kontakte, was über entsprechende Oberflächenrezeptoren vermittelt wird.

Weitere Mechanismen der angeborenen Immunität basieren auf Plasmaproteinen, die in der Leber produziert werden.

Komplementproteine werden durch Anwesenheit von Erregern aktiviert. Durch Opsonierung ermöglichen sie die Erkennung der Erreger durch Phagozyten. Bestimmte Komplementfragmente besitzen zusätzlich chemotaktische Wirkung auf Phagozyten. Krankheitserreger werden außerdem durch Porenbildung in ihrer Membran durch Komplementproteine zerstört.

Nach der Initiierung einer Entzündungsreaktion werden hauptsächlich in der Leber auch APPs produziert. Die Konzentration von positiven APPs steigt innerhalb weniger Stunden nach einer akuten Infektion stark an. Die Konzentration von negativen APPs sinkt stattdessen (Murphey *et al.*, 2008). Eine dauerhafte leichte Erhöhung ist meist bei einer chronischen Entzündung zu detektieren. Hierzu zählen z.B. das C-reaktive Protein (CRP), Haptoglobin (HP), LTF oder Fibrinogen. Zu deren Funktionen gehören jeweils die Komplementaktivierung, Hämoglobin- und Eisenbindung sowie die Vermittlung der Blutgerinnung. Die APP-Produktion ist speziesspezifisch. Während CRP beim Menschen und beim Schwein als wichtigstes APP bekannt ist, ist HP, aber nicht CRP, beim Rind stark erhöht und bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen sehr gut charakterisiert. APPs werden in der Diagnostik sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin oft als serologische Biomarker für entzündliche Erkrankungen diskutiert oder eingesetzt. Hierbei sind sie hoch sensitiv, aber wenig spezifisch für einzelne Erkrankungen (Petersen *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2004; Halim *et al.*, 2012; Benitez und Louis, 2014; Henriquez-Camacho und Losa, 2014; Hausfater, 2014).

Viele der zellulären und gelösten Immunkomponenten werden auch in die Milch übertragen. Am Beispiel von HP beschreiben Lai *et al.* (2009) verschiedene mögliche Transportwege in die Milch mittels lokaler Produktion durch vorhandene Immunzellen oder alveolare Epithelzellen und aktivem oder passivem Transport aus dem Serum. Diese Transportwege sind auch für andere gelöste Immunkomponenten wie Zytokine, APPs und Komplementfaktoren denkbar.

1.2.1 Polymorphnukleäre, neutrophile Granulozyten und ihre Rolle beim Milchrind

PMN sind die häufigsten Phagozyten im peripheren Blut. Im Rind haben sie hingegen nur einen Anteil an der Gesamtleukozytenzahl von 25 % (Jain, 1986). Während einer Entzündungsreaktion wird die Freisetzung weiterer PMN aus dem Knochenmark stimuliert (Summers *et al.*, 2010). Nach Aktivierung haften sie am Endothel der Blutgefäße und migrieren entlang eines Konzentrationsgradienten von Chemokinen wie CXCL-8 zum Ort der Entzündung oder Verletzung. Dort wirken sie lokal durch ihre Effektorfunktionen. Die Aktivierung von PMN kann über die Erkennung von bestimmten Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen (*Microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) mittels *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRRs) erfolgen. Weiterhin werden mit Komplementproteinen oder Antikörpern opsonierte Erreger über Bindung an Komplement- bzw. Fc-Rezeptoren

erkannt. Die Interaktion von MAMPs und PRRs initiiert die Phagozytose, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und die Degranulation. PMN besitzen mehrere Arten von Granula, die selektiv extra- oder intrazellulär freigesetzt werden können. Primäre oder azurophile Granula (Abbildung 2A, 1) beinhalten hauptsächlich Peroxidase. Lysozym ist, im Vergleich zu anderen Spezies, in bovinen PMN nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden (Rausch und Moore, 1975). Sekundäre oder spezifische Granula beinhalten antimikrobielle Peptide und Proteine wie LTF, HP (Theilgaard-Mönch *et al.*, 2006) und Metalloproteasen (Collagenase, Gelatinase) (Abbildung 2A, 2). PMN tragen so zur extrahepatischen Produktion von APPs bei. Die primären und sekundären Granula verschmelzen mit Phagosomen, sodass darin enthaltene Erreger abgetötet werden können. Tertiäre Granula enthalten hauptsächlich Gelatinase. Diese wird in den extrazellulären Raum abgegeben, um die Migration durch das Gewebe zu ermöglichen. Sekretorische Vesikel besitzen Membranrezeptoren, wie CD11b, CD14 und CD18, die bei Exozytose die Expressionsdichte des entsprechenden Rezeptors auf der Zelloberfläche erhöhen. Zusätzlich sind weitere, neuartige Granula bei Schafen, Ziegen und Kühen bekannt (Gennaro *et al.*, 1983). Diese sind größer als primäre und sekundäre Granula (Abbildung 2A, 3). Sie enthalten LTF, eine Gruppe von stark kationischen Proteinen, Baktenezine genannt (Zanetti *et al.*, 1990) sowie β -Defensine. (Paape *et al.*, 2003; Faurschou und Borregaard, 2003; Borregaard *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2010).

Die wichtigste Aufgabe der PMN ist der Schutz vor Erregern, die während der Laktation in das Euter eindringen können. Trotz intensiver Forschung ist die Euterentzündung (Mastitis) immer noch ein Grund für große finanzielle Einbußen in den Milchbetrieben (Hogeveen *et al.*, 2011). Während einer Mastitis werden PMN rekrutiert und migrieren durch das Eutergewebe in die Milch (Rainard und Riollot, 2003). Eine heftige, lokale Entzündungsreaktion kann über die Abgabe von ROS oder granulären Proteasen jedoch das Eutergewebe auch so stark schädigen, dass die Milchproduktion erheblich reduziert ist oder nicht mehr stattfinden kann (Paape *et al.*, 2002).

Aber auch in das nicht entzündete Euter wandert ständig eine geringe Zahl an PMN ein. Dort sind ihre Effektorfunktionen jedoch stark eingeschränkt. Sie besitzen eine rundliche Form mit weniger Pseudopodien, da sie Fettglobuli und Kaseinmizellen aus der Milch phagozytiert haben (Abbildung 2B und C). Die Anzahl an sekundären und neuartigen Granula ist dadurch ebenfalls stark reduziert, da sie mit den Phagosomen fusionieren (Paape *et al.*, 2003). Erklärungen für die Einwanderung von PMN in das

nicht entzündete Euter können zum einen latente Infektionen zum anderen bisher unbekannte physiologische Mechanismen sein (Rainard und Riollot, 2006).

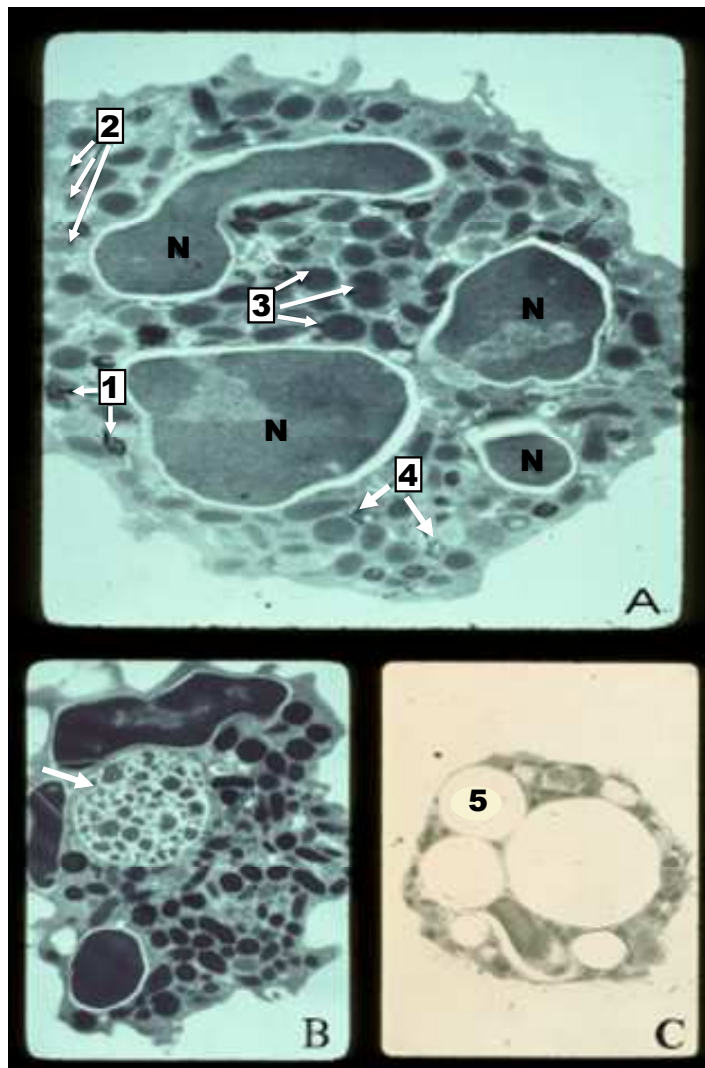


Abbildung 2:

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von bovinen PMN isoliert aus peripherem Blut und Milch.

(A) PMN aus Blut, 15.000 x,

N: polymorpher Nukleus,

1: primäre Granula,

2: sekundäre Granula,

3: neuartige Granula,

4: Glycogenpartikel

(B) PMN aus Milch mit einer

Vakuole, die phagozytierte

Kaseinmizellen enthält

(Pfeil), 11.250 x

(C) PMN aus Milch, 5.300 x

5: Phagosom mit Fettglobuli

Modifiziert nach (Paape *et al.*, 2003)

Eine negative Beeinflussung der Effektorfunktionen von PMN ist auch während der peripartalen Immunsuppression speziell beim Milchrind bekannt. Davon sind unter anderem Phagozytose, Migration, die Produktion von ROS und die Myeloperoxidaseaktivität betroffen (Kehrli, Jr. *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 1999; Mehrzad *et al.*, 2001). Als Gründe dafür gelten die mangelnde Nährstoffversorgung und hormonelle Umstellungen zu Beginn der Laktation. Unzureichende Verfügbarkeit von Glukose kann grundlegende Funktionen von PMN und Makrophagen einschränken. Zudem konnte gezeigt werden, dass chemotaktische Fähigkeiten (Suriyasathaporn *et al.*, 1999) und die Produktion von ROS (Hoeben *et al.*, 1997) *in vitro* durch β -Hydroxybutyrat, welches während einer Ketose produziert wird, verringert werden (Ingvartsen und Moyes, 2013).

Durch den entstehenden Stress bei der Kalbung, die Stoffwechselbelastungen und die eingeschränkten Funktionen der PMN sind die Milchkühe besonders anfällig für Infektionserkrankungen. Der Gesundheitszustand der Tiere sollte daher in diesem Zeitraum intensiv überwacht werden.

1.3 Gesundheitsmanagement im Milchbetrieb

1.3.1 Häufige Rindererkrankungen im Verlauf der Laktation

Die einsetzende Laktation erhöht den Kalzium- und Energiebedarf, welchen die Tiere oft nicht über eine erhöhte Futteraufnahme kompensieren können. Die Folge sind Stoffwechselerkrankungen, wie Hypokalzämie, Ketose und Labmagenverlagerung (Goff und Horst, 1997; DeGaris und Lean, 2008). Zusätzlich weisen die Kühe oft Nachgeburtsverhaltungen und Entzündungen im Uterus (Metritis, Endometritis) auf (Goff, 2006; Sordillo *et al.*, 2009; Dubuc *et al.*, 2010; Esposito *et al.*, 2014). Aber auch für Mastitis ist die Anfälligkeit erhöht (Burvenich *et al.*, 2007). Ungenügende Nährstoffversorgung und Erkrankungen, die in der frühen Laktation auftreten, können Fruchtbarkeitsprobleme verursachen (Sheldon *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2009).

Neben den Fruchtbarkeitsproblemen gehören Mastitis und Lahmheit zu den bedeutendsten Bestandsproblemen im Milchbetrieb (Bradley, 2002; Whay *et al.*, 2003; Bruijnis *et al.*, 2012). Bei mangelnder Stall- und Melkhygiene ist über die gesamte Laktation das Risiko für Euterentzündungen erhöht (Hogan und Smith, 2012). Beim Melken oder Liegen kommt das Euter mit potentiellen Infektionsquellen in Kontakt. Besonders leicht können die Erreger, meist Enterobakterien, Streptokokken oder Staphylokokken (Zadoks und Fitzpatrick, 2009), direkt nach dem Melken in das Euter eindringen, da der Strichkanal der Zitze noch nicht wieder verschlossen ist. Vor der Trockenstellung der Kühe ist die Kontrolle und Behandlung von Mastitis besonders wichtig, da die Erreger nicht mehr durch Melken ausgeschwemmt werden können, das Euter aber nur langsam einen adäquaten Schutz aufbauen kann (Winter *et al.*, 2009; Laven *et al.*, 2014).

Ungünstige stallbauliche Faktoren und ungenügende oder falsche Klauenpflege begünstigen zusätzlich die Entstehung von Lahmheiten durch Klauen- oder Gliedmaßenenerkrankungen. Die Klauen der Kühe weisen Lederhautdefekte und Sohlengeschwüre auf. Vorgeschädigte Klauen sind zunehmend anfällig für Infektionen. Verletzungen der Gliedmaßen entstehen z.B. durch Kollisionen mit der Stalleinrichtung. Die Tiere leiden unter starken Schmerzen, was die Liegezeiten erhöht. Sie verbringen zusätzlich weniger Zeit beim Fressen und weisen eine

schlechtere Milchproduktion auf (Galindo und Broom, 2002; Bergsten, 2003; Schöpke *et al.*, 2013).

Seltener treten auch Atemwegserkrankungen auf (Gorden und Plummer, 2010). Erkrankungen, wie z.B. Paratuberkulose, bovine virale Diarrhoe (BVD) und die Blauzungenkrankheit, konnten durch Impfstoffe eingedämmt werden (Benedictus und Kalis, 2003; Moennig *et al.*, 2005; Zientara und Sánchez-Vizcaíno, 2013).

Erkrankungen bedeuten zum einen eine enorme Beeinträchtigung des Tierwohls, aber auch finanzielle Einbußen für den Halter durch verringerte Milchleistung, Verwerfen von Milch, Einschränkung der Fruchtbarkeit, Behandlungsaufwand oder den Verlust des Tieres. Ziel des betrieblichen Managements ist es daher, die Kühe gesund zu erhalten und Erkrankungen so früh wie möglich zu detektieren. Das kann die Chance auf einen vollständigen Behandlungserfolg erhöhen.

1.3.2 Betriebliche Gesundheitsüberwachung

Die Betreuung der Tiergesundheit im Milchbetrieb beruht auf einer engen Zusammenarbeit von Bestandstierarzt und Betriebspersonal. Die Gesundheitskontrollen können regelmäßig täglich oder monatlich und auch anlassbezogen erfolgen. Die Überwachungsprogramme umfassen im Wesentlichen die Eutergesundheit, den Stoffwechsel sowie die Fruchtbarkeit und das Puerperium. Die regelmäßigen Gesundheitskontrollen erfolgen durch geschultes Betriebspersonal. Täglich wird im Melkstand vor dem Anrücken die Beschaffenheit des Euters und der Milch beurteilt (Winter *et al.*, 2009). Eine Puerperalkontrolle findet ca. 20 Tage nach der Kalbung statt. Dabei werden die Kühe anhand von Parametern wie Futteraufnahme, Körperkondition, Körpertemperatur, Verhalten, Milchleistung, Harnketonen, Beschaffenheit des Uterus und Vaginalsekret beurteilt. Meist wird hier der Bestandstierarzt hinzugezogen (Guterbock, 2004; Sheldon *et al.*, 2006; LeBlanc, 2010). Frischabkalber sollten jedoch bestenfalls täglich kontrolliert werden.

Für jedes Tier sollten zumindest aufgetretene Erkrankungen, durchgeführte diagnostische Tests und therapeutische Behandlungen, Klauenpflege, Besamungen, Konzeptionsrate, Laktationslänge sowie der Verlauf der Kalbung elektronisch oder auf Stallkarten dokumentiert werden.

Einmal monatlich erfolgt die Milchleistungsprüfung (MLP). Diese wird durch den Landeskontrollverband des jeweiligen Bundeslandes koordiniert und durchgeführt. Milchproben aller Kühe werden in externen Laboren untersucht. Es werden Parameter wie Zellzahl, Laktose-, Fett-, Eiweiß- und Harnstoffgehalt der Milch ermittelt. Mit Hilfe dieser Messwerte können der Stoffwechsel sowie die Eutergesundheit des Einzeltieres beurteilt werden.

Bei einer wachsenden Herdengröße ist die Automatisierung von Prozessen wie dem Melken und der Einzeltierüberwachung essentiell. Automatische Melksysteme werden zunehmend eingesetzt, funktionieren jedoch noch nicht optimal, um eine angemessene Melkhygiene und zuverlässige Mastitisedektion zu gewährleisten (Viguier *et al.*, 2009). Daher konnte die Eutergesundheit durch Einsatz von automatischen Melksystemen nicht verbessert werden (Hovinen und Pyorala, 2011). Im Betrieb können weiterhin Menge, Fluss, Leitfähigkeit, pH-Wert und Progesterongehalt der Milch, aber auch Futteraufnahme und Aktivität der Kühe automatisch erfasst werden. Einige Betriebe besitzen bereits die dafür nötige Messtechnik, das entsprechende Datenverarbeitungssystem sowie eine Software zur Interpretation der Daten. Brunst, Stoffwechselerkrankungen, Euterentzündungen oder Lahmheiten können hier anhand der Analyse von bestimmten Parameterkombinationen automatisch detektiert werden (Rutten *et al.*, 2013; Theurer *et al.*, 2013). Weiterhin wurden Programme zur automatischen Analyse von Klauenerkrankungen entwickelt (Kofler, 2013). Die Anschaffung dieser Systeme ist jedoch sehr kostenintensiv. In der Mehrheit der Betriebe sind deshalb noch keine automatisierten Systeme vorhanden. Die Gesundheitsüberwachung ist somit abhängig von entsprechend ausgebildetem und vor allem ausreichend vorhandenem Betriebspersonal. Allgemeiner Kritikpunkt ist die Subjektivität der durchgeführten Untersuchungen (Webster, 2005).

Nach der Detektion einer Erkrankung durch den Landwirt oder Tierarzt wird die entsprechende Therapie eingeleitet. Entzündungen des Euters oder im Uterus werden lokal oder systemisch mit Antibiotika behandelt. Aber auch zur Vorbeugung von Infektionen und Entzündungen werden häufig Antibiotika eingesetzt (Drillich *et al.*, 2006; Ruegg, 2009). Zur Prävention von Erkrankungen nach der Kalbung und daraus resultierenden Fruchtbarkeitsproblemen könnte auch bei der verbesserten Überwachung und Optimierung der peripartalen Nährstoffversorgung der Tiere angesetzt werden (Mulligan *et al.*, 2006; Ingvarsen und Moyes, 2013).

Während der Behandlung erkrankter Kühe gelangt nicht selten auch kontaminierte Milch in den Tank. Hauptsächlich lässt sich das durch organisatorische Fehler begründen. Dazu zählen z.B. die unzureichende Markierung behandelter Kühe oder mangelhafte Dokumentation von Therapien, ein kontaminiertes Melksystem durch falsche Melkreihenfolge, Überdosierung von Antibiotika oder das fehlende Einhalten der Sperrzeiten (Jones und Seymour, 1988).

Trotz hoch entwickelter, technischer Möglichkeiten ist die betriebliche Gesundheitsüberwachung in der Mehrheit der Milchbetriebe ungenügend. Um die Überwachung der Herdengesundheit und das Wohlergehen der Tiere zu verbessern

sowie den Antibiotikaeinsatz zu reduzieren, werden neue Biomarker benötigt, die einfach und vor Ort (*On-Farm*) bestimmbar sind und zuverlässig entzündliche Erkrankungen anzeigen. Langzeitbeobachtungen solcher Gesundheitsparameter könnten ebenfalls zur züchterischen Einschätzung der Gesundheitsstabilität heran gezogen werden (Boichard und Brochard, 2012; Egger-Danner *et al.*, 2015). Die Implementierung neuer Tests für die *On-Farm*-Nutzung ist im Wesentlichen abhängig vom Verhältnis des finanziellen und zeitlichen Aufwands zum Nutzen sowie von dessen Sensitivität und Spezifität. Robuste Messmethoden sind hierbei Voraussetzung für eine spätere Automatisierung der Bestimmung. Die Nutzung der Infrarot-Spektroskopie wird für die Erfassung neuer Gesundheitsparameter in der Milch diskutiert (Boichard und Brochard, 2012), da diese Methode ohne Zusatzaufwand z.B. während der MLP durchgeführt werden könnte. Sogar einzelne Milchproteine wie LTF könnten damit erfasst werden (Soyeurt *et al.*, 2012).

Auch weitere APPs wie Fibrinogen, Serumamyloid A und HP werden bereits als Biomarker diskutiert. Die Bestimmung in Serum und Milch soll die Detektion von entzündlichen Erkrankungen bzw. Mastitis ermöglichen. Der Gesundheitszustand des Einzeltieres sowie der Herde, der Schweregrad der Entzündung, Therapieerfolg, Ausmaß von post-operativen Komplikationen und die Prävalenz von Infektionen in bestimmten Tiergruppen könnten somit effizienter eingeschätzt werden (Petersen *et al.*, 2004; Pradeep, 2014).

1.4 Ziel der Arbeit

Die Folge von Infektionserkrankungen bei Milchkühen sind Behandlungskosten, Störungen der Fruchtbarkeit, Einschränkungen der Milchleistung sowie die Gefährdung des Wohlergehens der Tiere. Verbraucher und Gesetzgebung verlangen jedoch zunehmend nicht nur qualitativ hochwertige und antibiotikafreie Milch, sondern auch die Berücksichtigung des Tierwohls. Diese Entwicklungen haben zu einer Umorientierung bei den Zuchtzielen hin zu funktionellen Merkmalen wie Nutzungsdauer, Fruchtbarkeit und Gesundheitsstabilität geführt (Boichard und Brochard, 2012; Egger-Danner *et al.*, 2015). Hierzu werden immunologische Indikatoren (Biomarker) benötigt, die entzündliche Erkrankungen zuverlässig anzeigen und mit geringem zeitlichen und finanziellen Zusatzaufwand erfasst werden können. Die automatisierte Analyse solcher Gesundheitsparameter mit Hilfe robuster Testsysteme würde die Überwachung der wachsenden Tierbestände erheblich vereinfachen. Der gesamte Bestand könnte getestet und erkrankte Tiere früher detektiert und entsprechend behandelt werden. Durch eine Früherkennung könnten

der Schweregrad von Erkrankungen reduziert und die Chancen auf Behandlungserfolg gesteigert werden, wodurch Mehrkosten für verlängerte Therapiezeiträume, Antibiotikaeinsatz, Verluste an Milchleistung oder sogar des gesamten Tieres verringert werden könnten. Als potentielle Biomarker werden APPs wie Fibrinogen, Serumamyloid A und HP diskutiert. Im Serum zeigen diese akute und chronische Entzündungen an (Horadagoda *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2004). In der Milch wird vor allem HP als Marker für klinische und subklinische Mastitis favorisiert (Gronlund *et al.*, 2005; Haghighi *et al.*, 2010).

Durch die Nutzung von Gesundheitsparametern und Implementierung der Messung in die betriebliche Routine würden nicht nur die Gesundheit und das Wohlergehen der Tiere verbessert, sondern auch finanzielle Einbußen der Betriebe gemindert, züchterische Entscheidungen vereinfacht und die Qualität des Lebensmittels Milch gesichert werden, was einen enormen wirtschaftlichen, gesellschaftlichen und ethischen Nutzen mit sich bringt.

Ziel der Arbeit war daher die Identifizierung von neuen Biomarkern für den allgemeinen Gesundheitszustand von Hochleistungsmilchkühen. Um diese Biomarker einfach und schnell in einem automatischen Stalltest nachweisen zu können, lag der Fokus dabei auf den gelösten Proteinen in der Milch. Der neue Biomarker sollte nicht nur Mastitis, sondern vor allem auch Entzündungen außerhalb des Euters anzeigen können. Für die Detektion neuer Biomarker wurden Proben von Kühen in verschiedenen Krankheitszuständen verglichen. Hierbei wurden Erkrankungen des Euters und außerhalb des Euters einbezogen, welche in den Tierbeständen sehr häufig auftraten (Uterusentzündungen, Labmagenverlagerung, Klauenerkrankungen). Zu Beginn sollte das Gesamtspektrum an Immunkomponenten erfasst werden, weshalb zunächst auf Proteinexpressions- und zellulärer Ebene angesetzt wurde. Das schloss die Analyse von vorhandenen Immunzellpopulationen in Blut- und Milchproben ein, um einen Überblick über potentielle Produzenten der immunologischen Indikatoren zu erhalten. Die Produktion von ausgewählten, differentiell exprimierten Oberflächenmarkern wurde anschließend auf Transkript- sowie auf Proteinexpressionsebene validiert.

2 Publikation

Zoldan, K., Moellmer, T., Schneider, J., Fuedner, C., Knauer, J., Lehmann, J., 2014. Increase of CD25 expression on bovine neutrophils correlates with disease severity in post-partum and early lactating dairy cows. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 254-263.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145305X14002079>

doi:10.1016/j.dci.2014.08.002

3 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. med.

Auswahl und Validierung immunologischer Indikatoren für entzündliche Erkrankungen bei Hochleistungsmilchkühen

eingereicht von:

Diplom-Ingenieurin (FH) Martina Katharina Zoldan

geboren am 25.12.1986 in Berlin-Lichtenberg

angefertigt am:

Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig

betreut von Prof. Dr. Frank Emmrich (Institut für klinische Immunologie, Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig) und Dr. Jörg Lehmann (Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig)

Mai 2015

Mit wachsender Bevölkerung steigt auch der Bedarf an Lebensmitteln tierischer Herkunft. Auch die Milchindustrie musste diesen Entwicklungen begegnen. Der steigende wirtschaftliche Druck führte zur Fokussierung der Milchrindzucht auf die Milchleistung, was sich negativ auf die Gesundheitsstabilität von Hochleistungsmilchkühen wie dem Deutschen Holstein auswirkte. Vor allem nach der Kalbung und in der frühen Laktation zeigen die Kühe eine erhöhte Anfälligkeit für entzündliche Erkrankungen, wie Uterusentzündungen, Mastitis oder Lahmheiten. Das Einsetzen der Milchproduktion belastet den Stoffwechsel der Kühe. Eine negative Energiebilanz führt zu Stoffwechsel- und Hormonstörungen. Supprimierte Immunzellfunktionen und verminderte Fruchtbarkeit sind die Folgen. Die peripartale Immunsuppression wird beim Rind hauptsächlich auf die Einschränkung von Effektorfunktionen der polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten (PMN) zurückgeführt. Daher stellt der peripartale Zeitraum eine besonders kritische Zeit für die Gesundheit der Tiere und eine Herausforderung für das betriebliche

Gesundheitsmanagement dar. Es wird daher nach innovativen Methoden gesucht, die sich mit geringem zeitlichen und finanziellen Zusatzaufwand in die betriebliche Routine integrieren lassen. Auch bei der Milchrindzucht wird zunehmend Wert auf funktionelle Merkmale wie Nutzungsdauer, Fruchtbarkeit und Gesundheitsstabilität gelegt. Somit wird auch auf die Forderungen von Gesetzgebung und Verbraucher auf Verbesserung des Tierwohls und Sicherung der Lebensmittelqualität reagiert.

Dazu werden neue immunologische Indikatoren (Biomarker) benötigt, welche entzündliche Erkrankungen zuverlässig anzeigen und somit als Gesundheitsparameter einsetzbar sind. Der gesamte Bestand könnte getestet und erkrankte Tiere früher detektiert und entsprechend behandelt werden. Durch eine Früherkennung könnten der Schweregrad von Erkrankungen reduziert und die Chancen auf Behandlungserfolg gesteigert werden, wodurch Mehrkosten für verlängerte Therapiezeiträume, Antibiotikaeinsatz, Verluste an Milchleistung oder sogar des gesamten Tieres verringert werden könnten. Langzeitbeobachtungen der Gesundheitsparameter könnten ebenfalls zur züchterischen Einschätzung der Gesundheitsstabilität heran gezogen werden.

Als geeignete Biomarker gelten vor allem Akute-Phase-Proteine. Im Serum zeigen diese akute und chronische Entzündungen an. In der Milch wird vor allem Haptoglobin als Indikator für klinische und subklinische Mastitis genannt.

Ziel der Studie war die Identifizierung von neuen Biomarkern für den allgemeinen Gesundheitszustand von Hochleistungsmilchkühen. Um diese Biomarker einfach und schnell in einem automatischen Stalltest nachweisen zu können, lag der Fokus dabei auf den gelösten Proteinen in der Milch. Der Biomarker in der Milch sollte nicht nur Mastitis, sondern vor allem auch Entzündungen außerhalb des Euters anzeigen können.

Zur Identifizierung neuer Biomarker wurden Proben von Kühen in verschiedenen Krankheitsszuständen verglichen. Diese wurden in Kooperation mit lokalen Milchbetrieben und der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig gesammelt. Hierbei wurden Erkrankungen des Euters (klinische Mastitis aller Schweregrade, verschiedene Erreger) und außerhalb des Euters (systemische Erkrankungen; z.B. Uterusentzündungen, Labmagenverlagerung, Lahmheiten) einbezogen, welche in den Tierbeständen sehr häufig auftraten. Leichte systemische Erkrankungen wurden nach einigen Stunden bis Tagen direkt im Betrieb entdeckt, wohingegen schwere systemische Erkrankungen nach einigen Tagen bis Wochen in der Tierklinik diagnostiziert wurden.

Um das Gesamtspektrum an Immunkomponenten zu erfassen und einen Überblick über potentielle Produzenten der immunologischen Indikatoren zu erhalten, wurden

auch die Immunzellpopulationen in die Analysen einbezogen. In Blut- und Milchproben wurden mittels Durchflusszytometrie relevante Oberflächenmarker für Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten bestimmt. Die Produktion von ausgewählten, differentiell exprimierten Oberflächenmarkern wurde anschließend auf Transkriptebene mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sowie auf Proteinexpressionsebene validiert.

In dieser Studie konnte erstmals CD25 (α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, IL2R) auf bovinen PMN aus peripherem Blut nachgewiesen werden. Die Expression (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) von CD25 stieg dabei mit dem Schweregrad der entzündlichen Erkrankung an. Diese Ergebnisse konnten durch den Einsatz eines zweiten Antikörpers gegen CD25 anhand einer kleineren Stichprobe reproduziert werden. Zusätzlich zeigte die Genexpressionsanalyse die gleichen Unterschiede zwischen den Krankheitszuständen. Gleiche Tendenzen waren auch für Milchzellen erkennbar. In der *Receiver-Operating-Characteristic*(ROC)-Analyse zeigte CD25 auf PMN im peripheren Blut ein hohes Abgrenzungsvermögen für erkrankte Kühe mit einer Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,9. Die Messung von CD25 auf PMN könnte somit zur Bestimmung des allgemeinen Gesundheitszustandes von Hochleistungsmilchkühen genutzt werden.

Die Funktion von CD25 auf PMN ist bisher nicht bekannt. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Effektorfunktionen von humanen, porcinen oder bovinen PMN *in vitro* und *in vivo* durch Interleukin(IL)-2 moduliert werden können. Diese Effekte wurden jedoch hauptsächlich durch die β - und γ -Ketten des IL2R vermittelt. Die erhöhte Expression von CD25 auf PMN könnte neben der Signaltransduktion auch weitere immunologische Funktionen erfüllen. Nach enzymatischer Abspaltung von der Zelloberfläche könnte gelöstes CD25 (sCD25) freies IL-2 binden und damit eine immunsupprimierende Wirkung ausüben. Für nachfolgende Untersuchungen ist die Quantifizierung von sCD25 interessant, da dies eine Möglichkeit zur Vereinfachung der Bestimmung von CD25 als Gesundheitsparameter darstellt, sofern auch sCD25 ein ähnlich hohes Abgrenzungsvermögen aufweisen würde. Nach Entwicklung und Implementierung entsprechend robuster Messmethoden würde die regelmäßige Erfassung eines solchen Gesundheitsparameters auf Einzeltierbasis nicht nur die Gesundheit und das Wohlergehen der Tiere verbessern, sondern auch finanzielle Einbußen der Betriebe verringern, züchterische Entscheidungen stützen und die Qualität des Lebensmittels Milch sichern. Das würde einen enormen wirtschaftlichen, gesellschaftlichen und ethischen Vorteil mit sich bringen.

Zusätzlich könnten weitere Untersuchungen an PMN interessante regulatorische Mechanismen, neue Grundlagen zum Verständnis der peripartalen Immunsuppression sowie innovative therapeutische *Targets* erschließen.

4 Literaturverzeichnis

www.bmelv-statistik.de; am 24.01.2015, Tabelle SBT-0105046-0000 vom 12.01.2015

Benedictus, G., Kalis, C.J., 2003. Paratuberculosis: eradication, control and diagnostic methods. *Acta Vet. Scand.* 44, 231-241.

Benitez, J.M., Louis, E., 2014. Can We Predict the High-Risk Patient? *Dig. Dis.* 32, 328-336.

Bergsten, C., 2003. Causes, risk factors, and prevention of laminitis and related claw lesions. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 98, 157-166.

Boichard, D., Brochard, M., 2012. New phenotypes for new breeding goals in dairy cattle. *animal* 6, 544-550.

Bonyadian, M., Moshtaghi, H., khavan Taheri, M., 2014. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. *Vet. res. forum* 5, 29-34.

Borregaard, N., Sörensen, O.E., Theilgaard-Mönch, K., 2007. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28, 340-345.

Bradley, A.J., 2002. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *Vet. J.* 164, 116-128.

Bruijnjs, M.R.N., Beerda, B., Hogeveen, H., Stassen, E.N., 2012. Assessing the welfare impact of foot disorders in dairy cattle by a modeling approach. *animal* 6, 962-970.

Burvenich, C., Bannerman, D.D., Lippolis, J.D., Peelman, L., Nonnecke, B.J., Kehrli, J., Paape, M.J., 2007. Cumulative Physiological Events Influence the Inflammatory Response of the Bovine Udder to *Escherichia coli* Infections During the Transition Period¹. *J. Dairy Sci.* 90, Suppl., E39-E54.

Cai, T.Q., Weston, P.G., Lund, L.A., Brodie, B., McKenna, D.J., Wagner, W.C., 1994. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. *Am. J. Vet. Res.* 55, 934-943.

Caroli, A., Poli, A., Ricotta, D., Banfi, G., Cocchi, D., 2011. Invited review: Dairy intake and bone health: A viewpoint from the state of the art. *J. Dairy Sci.* 94, 5249-5262.

Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Prat, M.D., 2009. Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 877-891.

- Croney, C.C., Anthony, R., 2011. Invited review: ruminating conscientiously: scientific and socio-ethical challenges for US dairy production. *J. Dairy Sci.* 94, 539-546.
- Cross, M.L., Gill, H.S., 2000. Immunomodulatory properties of milk. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1, S81-S89.
- DeGaris, P.J., Lean, I.J., 2008. Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176, 58-69.
- Drillich, M., Reichert, U., Mahlstedt, M., Heuwieser, W., 2006. Comparison of Two Strategies for Systemic Antibiotic Treatment of Dairy Cows with Retained Fetal Membranes: Preventive vs. Selective Treatment. *J. Dairy Sci.* 89, 1502-1508.
- Dror, D.K., Allen, L.H., 2014. Dairy product intake in children and adolescents in developed countries: trends, nutritional contribution, and a review of association with health outcomes. *Nutr. Rev.* 72, 68-81.
- Dubuc, J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Walton, J.S., LeBlanc, S.J., 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 5764-5771.
- Egger-Danner, C., Cole, J.B., Pryce, J.E., Gengler, N., Heringstad, B., Bradley, A., Stock, K.F., 2015. Invited review: overview of new traits and phenotyping strategies in dairy cattle with a focus on functional traits. *animal* 9, 191-207.
- Esposito, G., Irons, P.C., Webb, E.C., Chapwanya, A., 2014. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 144, 60-71.
- Faurschou, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5, 1317-1327.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic & Professional, London, UK.
- Galindo, F., Broom, D.M., 2002. The Effects of Lameness on Social and Individual Behavior of Dairy Cows. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 5, 193-201.
- Gennaro, R., Dewald, B., Horisberger, U., Gubler, H.U., Baggiolini, M., 1983. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell Biol.* 96, 1651-1661.
- Gill, H., Prasad, J., 2008. *Probiotics, Immunomodulation, and Health Benefits, Bioactive Components of Milk*, Springer, New York, USA.
- Goff, J.P., 2006. Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health. *J. Dairy Sci.* 89, 1292-1301.

- Goff, J.P., Horst, R.L., 1997. Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *J. Dairy Sci.* 80, 1260-1268.
- Gorden, P.J., Plummer, P., 2010. Control, Management, and Prevention of Bovine Respiratory Disease in Dairy Calves and Cows. *Vet. Clin. N. Am. : Food Anim. Pract.* 26, 243-259.
- Gronlund, U., Hallen, S.C., Persson, W.K., 2005. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis. *Vet Res.* 36, 191-198.
- Guterbock, W.M., 2004. Diagnosis and treatment programs for fresh cows. *Vet. Clin. N. Am. : Food Anim. Pract.* 20, 605-626.
- Haghkhah, M., Nazifi, S., Jahromi, A., 2010. Evaluation of milk haptoglobin and amyloid A in high producing dairy cattle with clinical and subclinical mastitis in Shiraz. *Comp. Clin. Pathol.* 19, 547-552.
- Halim, S.A., Newby, L.K., Ohman, E.M., 2012. Biomarkers in Cardiovascular Clinical Trials: Past, Present, Future. *Clin. Chem.* 58, 45-53.
- Hausfater, P., 2014. Biomarkers and infection in the emergency unit. *Med. Maladies Infect.* 44, 139-145.
- Henriquez-Camacho, C., Losa, J., 2014. Biomarkers for Sepsis. *Biomed. Res. Int.* 2014, 547818-547823.
- Hodgkinson, A.J., McDonald, N.A., Hine, B., 2014. Effect of raw milk on allergic responses in a murine model of gastrointestinal allergy. *Br. J. Nutr.* 112, 390-397.
- Hoeben, D., Heyneman, R., Burvenich, C., 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 165-170.
- Hogan, J., Smith, K.L., 2012. Managing Environmental Mastitis. *Vet. Clin. N. Am. : Food Anim. Pract.* 28, 217-224.
- Hogeveen, H., Huijps, K., Lam, T.J.G.M., 2011. Economic aspects of mastitis: New developments. *N. Z. Vet. J.* 59, 16-23.
- Hogeveen, H., Ouweltjes, W., 2003. Sensors and management support in high-technology milking. *J. Anim. Sci.* 81, 1-10.
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M.G., Gibbs, H.A., Reid, S.W.J., Horadagoda, A., Edwards, S.E.R., Eckersall, P.D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.* 144, 437-441.

- Horton, B.S., 1995. Commercial Utilization of Minor Milk Components in the Health and Food Industries. *J. Dairy Sci.* 78, 2584-2589.
- Hovinen, M., Pyorala, S., 2011. Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *J. Dairy Sci.* 94, 547-562.
- Husu-Kallio, J., 2008. Animal health and animal welfare: is it the same thing? *Acta Vet. Scand.* 50, S2-S2.
- Ingvartsen, K.L., Moyes, K., 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *animal* 7, 112-122.
- Jain, M.C., 1986. *Schalm's Veterinary Hematology*, Lee and Febiger, Philadelphia, PA, USA.
- Jakobsson, H.E., Jernberg, C., Andersson, A.F., Sjölund-Karlsson, M., Jansson, J.K., Engstrand, L., 2010. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS one* 5, e9836
- Jones, G.M., Seymour, E.H., 1988. Cowside Antibiotic Residue Testing. *J. Dairy Sci.* 71, 1691-1699.
- Jones, W.P., Hansen, L.B., Chester-Jones, H., 1994. Response of Health Care to Selection for Milk Yield of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 77, 3137-3152.
- Junza, A., Montané, A., Barbosa, J., Minguillón, C., Barrón, D., 2014. High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from beta-lactam antibiotics in thermally treated milk. *J. Chromatogr. A* 1368, 89-99.
- Kehrli, M.E., Jr., Nonnecke, B.J., Roth, J.A., 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50, 207-214.
- Kelleher, S.L., Lönnnerdal, B., 2001. *Immunological Activities Associated with Milk, Advances in Nutritional Research*, Springer, New York, USA.
- Kimura, K., Goff, J.P., Kehrli, J., 1999. Effects of the Presence of the Mammary Gland on Expression of Neutrophil Adhesion Molecules and Myeloperoxidase Activity in Periparturient Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 82, 2385-2392.
- Kofler, J., 2013. Computerised claw trimming database programs as the basis for monitoring hoof health in dairy herds. *Vet. J.* 198, 358-361.
- Lai, I.H., Tsao, J.H., Lu, Y.P., Lee, J.W., Zhao, X., Chien, F.L., Mao, S.J., 2009. Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis affected milk. *Vet. Res.* 40, 17-29.

- Laven, R.A., Balcomb, C.C., Tulley, W.T., Lawrence, K.E., 2014. Effect of dry period length on the effect of an intramammary teat sealant on the risk of mastitis in cattle treated with antibiotics at drying off. *N. Z. Vet. J.* 62, 214-220.
- LeBlanc, S., 2010. Monitoring Metabolic Health of Dairy Cattle in the Transition Period. *J. Reprod. Dev.* 56, S29-S35.
- Loss, G., Depner, M., Ulfman, L.H., van Neerven, R.J.J., Hose, A.J., Genuneit, J., Karvonen, A.M., Hyvärinen, A., Kaulek, V., Roduit, C., Weber, J., Lauener, R., Pfefferle, P.I., Pekkanen, J., Vaarala, O., Dalphin, J.C., Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., Ege, M.J., 2015. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections. *J. Allergy Clin. Immunol.* 135, 56-62.
- Lucy, M.C., 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *J. Dairy Sci.* 84, 1277-1293.
- Mehrzhad, J., Dosogne, H., Meyer, E., Heyneman, R., Burvenich, C., 2001. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 68, 399-415.
- Moennig, V., Houe, H., Lindberg, A., 2005. BVD control in Europe: current status and perspectives. *Anim. Health Res. Rev.* 6, 63-74.
- Mulligan, F.J., O'Grady, L., Rice, D.A., Doherty, M.L., 2006. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 331-353.
- Mungai, E.A., Behravesh, C.B., Gould, L.H., 2015. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 119-122.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28-40.
- Murphey, K.M., Travers, P., Walport, M., 2008. *Janeway's Immunobiology*, 7th Edition, Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, USA.
- Oliver, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., Murinda, S.E., 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 793-806.
- Paape, M., Mehrzhad, J., Zhao, X., Detilleux, J., Burvenich, C., 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 109-121.
- Paape, M.J., Bannerman, D.D., Zhao, X., Lee, J.W., 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet. Res.* 34, 597-627.

- Pereira, R.V.V., Siler, J.D., Bicalho, R.C., Warnick, L.D., 2014. In vivo Selection of Resistant E. coli after Ingestion of Milk with Added Drug Residues. PloS one 9, e115223
- Peter, A.T., Vos, P.L.A.M., Ambrose, D.J., 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. Theriogenology 71, 1333-1342.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet. Res. 35, 163-187.
- Potter, M.E., Kaufmann, A.F., Blake, P.A., Feldman, R.A., 1984. Unpasteurized milk: The hazards of a health fetish. JAMA 252, 2048-2052.
- Pradeep, M., 2014. Application of acute phase proteins as biomarkers in modern veterinary practice. Ind. J. Vet. Anim. Sci. Res. 43, 1-13.
- Rainard, P., Riollot, C., 2003. Mobilization of neutrophils and defense of the bovine mammary gland. Reprod. Nutr. Dev. 43, 439-457.
- Rainard, P., Riollot, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet Res. 37, 369-400.
- Rathe, M., Müller, K., Sangild, P.T., Husby, S., 2014. Clinical applications of bovine colostrum therapy: a systematic review. Nutr. Rev. 72, 237-254.
- Rausch, P.G., Moore, T.G., 1975. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils: A phylogenetic comparison. Blood 46, 913-919.
- Richtlinie 92/46/ EWG des Rates vom 16.Juni, 1992. mit Hygienevorschriften für die Herstellung und Vermarktung von Rohmilch, wärmebehandelter Milch und Erzeugnissen auf Milchbasis. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften L268,
- Robinson, T.J., Scheftel, J.M., Smith, K.E., 2014. Raw milk consumption among patients with non-outbreak-related enteric infections, Minnesota, USA, 2001-2010. Emerg. Infect. Dis. 20, 38-44.
- Ruegg, P.L., 2009. Management of mastitis on organic and conventional dairy farms. J. Anim. Sci. 87, 43-55.
- Rutten, C.J., Velthuis, A.G.J., Steeneveld, W., Hogeveen, H., 2013. Invited review: Sensors to support health management on dairy farms. J. Dairy Sci. 96, 1928-1952.
- Schöpke, K., Weidling, S., Pijl, R., Swalve, H.H., 2013. Relationships between bovine hoof disorders, body condition traits, and test-day yields. J. Dairy Sci. 96, 679-689.

- Sheldon, I.M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H.J., 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol. Reprod.* 81, 1025-1032.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.
- Simenew, K., Wondu, M., 2013. Transition Period and Immunosuppression: Critical Period of Dairy Cattle Reproduction. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 5, 44-57.
- Sordillo, L.M., Shafer-Weaver, K., DeRosa, D., 1997. Immunobiology of the Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 80, 1851-1865.
- Sordillo, L.M., Contreras, G.A., Aitken, S.L., 2009. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim. Health Res. Rev.* 10, 53-63.
- Soyeurt, H., Bastin, C., Colinet, F.G., Arnould, V.M.R., Berry, D.P., Wall, E., Dehareng, F., Nguyen, H.N., Dardenne, P., Schefers, J., Vandenplas, J., Weigel, K., Coffey, M., Theron, L., Detilleux, J., Reding, E., Gengler, N., McParland, S., 2012. Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *animal* 6, 1830-1838.
- Stear, M.J., Bishop, S.C., Mallard, B.A., Raadsma, H., 2001. The sustainability, feasibility and desirability of breeding livestock for disease resistance. *Res. Vet. Sci.* 71, 1-7.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T.T., 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. *J. Anim. Sci.* 87, 3-9.
- Struff, W.G., Sprotte, G., 2007. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: a review. Part I: biotechnological standards, pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics and principles of treatment. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 45, 193-202.
- Struff, W.G., Sprotte, G., 2008. Bovine colostrum as a biologic in clinical medicine: a review--Part II: clinical studies. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 46, 211-225.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condcliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R., 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31, 318-324.
- Suriyasathaporn, W., Daemen, A.J.J.M., Noordhuizen-Stassen, E.N., Dieleman, S.J., Nielen, M., Schukken, Y.H., 1999. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68, 177-186.
- Terico, A.T., Gallagher, J.C., 2014. Beta-Lactam Hypersensitivity and Cross-Reactivity. *J. Pharm. Pract.* 27, 530-544.

- Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L.C., Nielsen, M.J., Rasmussen, T., Udby, L., Gharib, M., Arkwright, P.D., Gombart, A.F., Calafat, J., Moestrup, S.K., Porse, B.T., Borregaard, N., 2006. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 108, 353-361.
- Theurer, M.E., Amrine, D.E., White, B.J., 2013. Remote Noninvasive Assessment of Pain and Health Status in Cattle. *Vet. Clin. N. Am. : Food Anim. Pract.* 29, 59-74.
- Torres, M.J., Mayorga, C., Blanca-Lopez, N., Blanca, M., 2014. Hypersensitivity Reactions to Beta-Lactams, T Lymphocytes as Tools in Diagnostics and Immunotoxicology, Springer, Basel, Schweiz.
- Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol.* 27, 486-493.
- Webster, J., 2005. The assessment and implementation of animal welfare: theory into practice. *Rev. Sci. Tech.* 24, 723-734.
- Whay, H.R., Main, D.C.J., Green, L.E., Webster, A.J.F., 2003. Assessment of the welfare of dairy cattle using animal-based measurements: direct observations and investigation of farm records. *Vet. Rec.* 153, 197-202.
- Wheeler, T.T., Hodgkinson, A.J., Prosser, C.G., Davis, S.R., 2007. Immune Components of Colostrum and Milk - A Historical Perspective. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12, 237-247.
- Winter, P., Burvenich, C., Hogeveen, H., Neijenhuis, F., Rasmussen, M., Schweigert, F., de Spiegeleer, B., Zehle, H., 2009. *Praktischer Leitfaden Mastitis: Vorgehen beim Einzeltier um im Bestand, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH & Co. KG, Stuttgart, Germany.*
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., Edwards, S.W., 2010. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49, 1618-1631.
- Zadoks, R., Fitzpatrick, J., 2009. Changing trends in mastitis. *Ir. Vet. J.* 62 Suppl. 4, 59-70.
- Zanetti, M., Litteri, L., Gennaro, R., Horstmann, H., Romeo, D., 1990. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. *J. Cell Biol.* 111, 1363-1371.
- Zientara, S., Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2013. Control of bluetongue in Europe. *Vet. Microbiol.* 165, 33-37.

5 Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Protein
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
AUC	(<i>area under the curve</i>) Fläche unter der Kurve
BVD	bovine virale Diarrhoe
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CRP	C-reaktives Protein
EU	Europäische Union
HP	Haptoglobin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2R	Interleukin-2-Rezeptor
LTF	Laktoferrin
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MLP	Milchleistungsprüfung
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMN	polymorphnukleäre, neutrophile Granulozyten
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sCD25	gelöstes (<i>soluble</i>) CD25
T _c	cytotoxische T-Zellen
T _h	T-Helfer-Zellen
T _{reg}	regulatorische T-Zellen

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Laktationskurven verschiedener Milchrindrassen.....	5
Abbildung 2: Transmissionselektronen-mikroskopische Aufnahme von bovinen PMN isoliert aus peripherem Blut und Milch.....	9

7 Anlagen

7.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

7.2 Persönlicher und wissenschaftlicher Werdegang

7.2.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martina Katharina Zoldan
Geburtsdatum und -ort: 25.12.1986, Berlin-Lichtenberg
Familienstand: ledig

Ausbildung und Studium

09/1997 bis 07/1999 64. Mittelschule, Dresden-Laubegast

09/1999 bis 07/2000 Gymnasium Dresden-Gruna

09/2000 bis 07/2005 Theodor-Mommsen-Gymnasium, Leipzig
Leistungsfächer: Deutsch und Biologie
Abschluss: Abitur (1,6)

10/2005 bis 03/2010 Hochschule Mannheim
Studiengang: Biotechnologie
Graduierung: Diplom (1,2), mit Auszeichnung
Akademischer Grad: Dipl.-Ing.(FH)

Praktische und berufliche Erfahrungen

09/2006 bis 02/2007 Praxissemester am Fraunhofer-Institut für
Zelltherapie und Immunologie, Leipzig
Thema: „Applikation und Validierung des
Zellseparationsroboters CellCelector™“

10/2007 bis 12/2007 Studienarbeit am Institut für Molekular- und
Zellbiologie, Hochschule Mannheim
Thema: „Expressionsmodulation eines
Luziferase-Reportergenkonstruktes
durch Sequenzbereiche einer humanen mRNA“

03/2008 bis 08/2008	Praxissemester an der Memorial University of Newfoundland and Labrador, St. John's, Kanada, Thema: <i>"Modification of a Method for Protein Extraction from Northern Shrimp Shell and Head Waste to obtain highly nutritious Animal Feed"</i>
08/2009 bis 03/2010	Diplomarbeit am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig Thema: „Entwicklung und Validierung von Methoden und Applikationsprotokollen zur praktischen Anwendung des Zellseparationsroboters CellCelector™ der zweiten Generation“
ab 04/2010	Doktorandin (medizinische Fakultät der Universität Leipzig) am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig Arbeitsgruppe Zelltechniken / GLP Thema: „Auswahl und Validierung von Biomarkern in der Milch für das On-Farm-Recording zur Leistungsüberprüfung auf Gesundheitsstabilität beim Rind“
04/2010 bis 05/2014	Archivarin - GLP (<i>Good Laboratory Practice</i>)
05/2013 und 06/2013	Forschungsaufenthalt am Royal Veterinary College, London, Thema: <i>"Investigation of the effect of Interleukin-2 on bovine granulocytes"</i> Referenz: Prof. Dr. Dirk Werling: dwerling@rvc.ac.uk
ab 05/2014	stellvertretende Leiterin der GLP-Prüfeinrichtung des Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie

7.2.2 Publikationen

Publikationen in wissenschaftlichen Journalen

Zoldan, K., Moellmer, T., Schneider, J., Fueldner, C., Knauer, J., Lehmann, J., 2014. Increase of CD25 expression on bovine neutrophils correlates with disease severity in post-partum and early lactating dairy cows. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 254-263.

Application Notes

Zoldan, K., Arnold, A., Stolzing, A., Lehmann, J., 2010. Visualizing of migration, interaction, proliferation or differentiation of cells in time lapse exposures using the cell separation robot CellCelector, *Nature Methods Application Notes*, doi:10.1038/an7729

Zoldan, K., Knauer, J., Lehmann, J., 2010. Automated clonal selection of high-producing hybridoma colonies from methylcellulose-based, semi-solid medium using the cell separation robot CellCelector, *Nature Methods Application Notes*, doi:10.1038/an7719

Zoldan, K., Arnold, A., Stolzing, A., Lehmann, J., 2010. Automated harvest of induced pluripotent stem cell colonies and colony fractions using the cell separation robot CellCelector, *Nature Methods Application Notes*, doi:10.1038/an7723

Zoldan, K., Fueldner, C., Schubert, A., Lehmann, J., 2010. Automated isolation of semi-adherent macrophage-like cells from a fibroblast-contaminated culture using the cell separation robot CellCelector. *Nature Methods Application Notes*, doi:10.1038/an7728

Abstracts zu Postern

Zoldan, K., Földner, C., Lehmann, J.: Development and validation of methods and protocols for practical application of the automated cell transfer system CellCelector™ (2nd generation). *8th Research Festival for Life Sciences 2009, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Ronneberger, B., Lehmann, J.: Rapid alternative method for clonal selection of high-producing hybridoma colonies from methylcellulose-based, semi-solid medium using the cell separation robot CellCelector™. *15th Leipziger Workshop 2010, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Ronneberger, B., Lehmann, J.: Combination of a modified fluorescent labelling method and high-throughput automation technology for faster clonal selection of high-producing hybridoma colonies from semi-solid medium. *40th Annual Meeting of the German Society of Immunology 2010, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Földner, C., Lehmann, J.: Automated isolation of semi-adherent macrophages from a fibroblast-contaminated culture using the cell separation robot CellCelector™. *40th Annual Meeting of the German Society for Immunology 2010, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Földner, C., Lehmann, J.: Automated isolation of semi-adherent macrophages from a fibroblast-contaminated culture using the cell separation robot CellCelector™. *9th Research Festival for Life Sciences 2010, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Eberhardt, J., Földner, C., Knauer, J., Lehmann, J.: Automated isolation of semi-adherent macrophages from a fibroblast-contaminated culture using the multifunctional, robotic cell separation robot CellCelector™. *World conference on regenerative medicine 2011, Leipzig, Germany.*

Zoldan, K., Möllmer, T., Földner, C., Knauer, J., Pache, S., Lehmann, J.: Immunological biomarkers in milk for monitoring the systemic health status of Holstein dairy cows. *Annual Meeting of the Study Group "Veterinary Immunology" of the German Society for Immunology 2011, München, Germany*

Zoldan, K., Möllmer, T., Földner, C., Knauer, J., Goerigk, D., Fuerll, M., Kauffold, J., Fischer, R., Bergfeld, U., Pache, S., Lehmann, J.: Use of immunologic biomarkers in milk for monitoring the systemic health status in Holstein dairy cows. *European Veterinary Immunology Workshop 2012, Edinburgh, United Kingdom*

Zoldan, K., Möllmer, T., Földner, C., Knauer, J., Pache, S., Lehmann, J.: Use of biomarkers in milk for monitoring the systemic health status in Holstein dairy cows. *European Conference on Immunology 2012, Glasgow, United Kingdom*

Zoldan, K., Kreß, J., Möllmer, T., Frank, F., Földner, C., Knauer, J., Fuerll, M., Kauffold, J., Starke, A., Fischer, R., Bergfeld, U., Pache, S., Lehmann, J.: Milk haptoglobin - immunological biomarker for health monitoring of dairy cows. *43rd Annual Meeting of the German Society of Immunology 2013, Mainz, Germany*

Abstracts zu Vorträgen

Zoldan, K., Möllmer, T., Schneider, P., Frank, F., Fischer, R., Bergfeld, U., Pache, S., Lehmann, J.: Haptoglobin in der Milch - potentieller Biomarker zur Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustands beim Milchrind. *Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Züchtungskunde und der Gesellschaft für Tierzuchtwissenschaften 2012, Halle/Saale, Germany*

Zoldan, K., Möllmer T., Frank, F., Földner C., Knauer, J., Goerigk, D., Fuerll, F., Kauffold, J., Fischer, R., Bergfeld, U., Pache, S., Lehmann, J.: Haptoglobin in milk - potential biomarker of inflammation for health monitoring of dairy cows. *Annual Meeting of the Study Group "Veterinary Immunology" of the German Society for Immunology, 2013, Vienna, Austria*

K. Zoldan, T. Moellmer, C. Földner, J. Knauer, D. Werling, M. Fuerll, A. Starke, R. Fischer, S. Pache, U. Bergfeld, , J. Lehmann: Neutrophil CD25 increases with disease severity in postpartum and early lactating dairy cows. *Annual Meeting of the Study Group "Veterinary Immunology" of the German Society for Immunology, 2014, Jena, Germany*

Prohl, A., Lohr, M., Ostermann, C., Kühnert, C., Zoldan, K., Lehmann, J., Menge, C., Liebler-Tenorio, E., Reinhold, P., Berndt, A.: Changes in bovine blood leukocyte surface markers after intrabronchial inoculation with *Chlamydia psittaci*. *Annual Meeting of the Study Group "Veterinary Immunology" of the German Society for Immunology, 2014, Jena, Germany*

K. Zoldan: Vorstellung Verbundprojekt: "Entwicklung und Nutzung neuer On-Farm-Verfahren zur Leistungsprüfung auf Gesundheitsstabilität und Fruchtbarkeit beim

Deutschen Holstein“ (Breeding), *Innovationstage der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, 2014, Bonn, Germany*

7.3 Danksagung

Für die Beiträge zum erfolgreichen Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich hiermit bei allen beteiligten Personen herzlich bedanken.

Die Förderung des Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) aufgrund eines Beschlusses des deutschen Bundestages. Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

Besonderen Dank richte ich an Dr. Jörg Lehmann der mir die Möglichkeit bot, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Meine wissenschaftliche und persönliche Weiterentwicklung hat er stets in besonderem Maß gefördert und seit dem 3. Semester meines Studiums über Praxissemester, Diplomarbeit und Doktorarbeit begleitet. Ich bedanke mich für die wissenschaftliche Betreuung des Projekts, seine aufgebrachte Geduld und die konstruktiven Gespräche, die auch bis in die späten Abendstunden andauern konnten.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Frank Emmrich für die Betreuung seitens der medizinischen Fakultät, Leipzig.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Monika Krüger (Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig) und Prof. Dr. Uwe Rösler (Institut für Tier- und Umwelthygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität, Berlin) für die Begutachtung meiner Dissertationsarbeit bedanken.

Vielen Dank möchte ich an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter der gesamten AG Lehmann für die stets sehr fröhliche und angenehme Arbeitsatmosphäre richten. Bei Dr. Jens Knauer möchte ich mich für die Hilfe bei der Methodenetablierung und wissenschaftliche Unterstützung herzlich bedanken. Mein großer Dank geht auch an Ulrike Scholz und Martina Conrad, die bei allen kleinen und großen Sorgen im Labor stets mit tatkräftiger Unterstützung zur Seite standen. Ganz besonderen Dank richte ich auch an meine Kollegin und Freundin Dr. Christiane Földner, die mit mir durch sämtliche wissenschaftlichen und persönlichen Höhen und Tiefen gegangen ist und mich immer mit sehr viel Erfahrung und gutem Rat im Arbeitsalltag motiviert hat. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Sina Riemschneider und Janine Kohlschmidt bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Außerdem möchte ich mich bei den Studentinnen Sarah Riedel, Anja Giese, Susann Reinert, Juliane Röthe, Gabriele Stephan, Mandy Geisler, Stefanie Heidenreich und

ganz besonders bei Josephine Schneider und Bernadette Obst bedanken, die das Projekt mit großem Engagement voran gebracht haben.

Bei den Kollegen vom Sächsischen Landesamt für Landwirtschaft, Umwelt und Geologie Dr. Uwe Bergfeld, Dr. Steffen Pache, Dr. Ralf Fischer und Theresa Möllmer möchte ich mich für die Koordination des Verbundprojektes und die exzellente Zusammenarbeit bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Manfred Füll, Prof. Dr. Alexander Starke, Prof. Dr. Johannes Kauffold, Dr. Daniela Goerigk, Juliane Munzel, Maria Reckardt und Hendrik Müller (Medizinische Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät, Leipzig) für den wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung bei der Probensammlung.

Bei Prof. Dr. Dirk Werling (Royal Veterinary College, London) möchte ich mich für die Förderung meines persönlichen und wissenschaftlichen Werdeganges und die Unterstützung und konstruktive Kritik beim Verfassen der Publikation und Dissertation herzlich bedanken. Ebenfalls vielen Dank an Dr. Ulla Schwertassek für die Korrekturen an Publikation und Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei allen meinen lieben Freunden bedanken, die mich in jeder Situation immer mit offenen Armen empfangen haben.

Ganz besonderen Dank richte ich an meine Familie und meine Eltern, die mich mit allen Mitteln und sehr viel Durchhaltevermögen unterstützt haben, damit ich mein Ziel verfolgen und erreichen konnte.

Tiefsten Dank richte ich an meinen Freund Jan, der mir mit großer Geduld und sehr viel Ruhe zu jeder Tages- und Nachtzeit eine emotionale Stütze war und ist.